



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Off nl gungsschrift
⑩ DE 195 21 938 A 1

⑤1 Int. Cl.⁶:
A 61 K 38/12

②1 Aktenzeichen: 195 21 938.4
②2 Anmeldetag: 7. 6. 95
④3 Offenlegungstag: 19. 12. 96

DE 19521938 A1

⑦1 Anmelder:

Vollenbroich, Dirk, Dipl.-Ing., 12049 Berlin, DE;
Vater, Joachim, Priv.-Doz. Dr., 10587 Berlin, DE;
Pauli, Georg, Prof. Dr., 13353 Berlin, DE

⑦4 Vertreter:

Patentanwälte Gulde Hengelhaupt Ziebig, 10785
Berlin

⑦2 Erfinder:

gleich Anmelder

⑤6 Entgegenhaltungen:

DE 18 03 987 A
EP 03 37 731 A2

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verwendung von zyklischen Lipopeptiden als Antibiotika gegen Mikroorganismen der Klasse Mollicutes

⑤7 Vertreter der Mikroorganismenklasse Mollicutes, wie z. B. die Mykoplasmen, sind als Erreger von Krankheiten beim Menschen und beim Tier oder als parasitäre Kontaminationskeime von Zellkulturen bekannt und können nur schwer mit Antibiotika effektiv bekämpft werden. Zyklische Lipopeptide sollen durch ihre bessere antibiotische Aktivität gegenüber Mykoplasmen und der geringeren Zytotoxizität auf die befallenen Wirtszellen gegenüber bisher angewandten Antibiotika eine effektivere Inaktivierung ermöglichen. Die Verwendung des zyklischen Lipopeptids Surfactin bei der Behandlung von Zellkulturen erfolgt durch direkte Zugabe in das Kulturmedium über den Zeitraum von einer Zellpassage. Durch die Behandlung ist eine vollständige Inaktivierung der Mykoplasmen möglich und das Antibiotikum kann durch Mediumwechsel entfernt werden. Zyklische Lipopeptide eignen sich nicht nur für die Eliminierung von Mykoplasmenkontaminationen aus Zellkulturen, sondern auch als Medikament gegen Mykoplasmeninfektionen oder bei der Herstellung und Konservierung von Erzeugnissen aller Art, bei denen eine Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen ist.

DE 19521938 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Anwendung zyklischer Fettsäure-haltiger Peptide, die sich zur Eliminierung und Vermeidung von Kontaminationen, hervorgerufen durch Mikroorganismen der Klasse Mollicutes, in verschiedenen pharmazeutischen, biotechnologischen und medizinischen Bereichen, insbesondere als Zusatzstoff für Zell-, Gewebe- und Organkulturen, der Produktion von verschiedenen pharmazeutischen Erzeugnissen, zur Behandlung von Labortieren und Pflanzen bzw. zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten verwenden lassen.

Mikroorganismen der Klasse Mollicutes, zu der die Mykoplasmatales, Acholeplasmataceae und die Spiroplasmataceae zählen, sind als sogenannte Mykoplasma-Infektionen typische Kontaminationskeime in der Biotechnologie, vor allem in der Zellkulturtechnik. In Zellkulturen aus verschiedenen Laboratorien ist eine Mykoplasmainzidenz mit einer Häufigkeit von 5–87% beobachtet worden. In nur 0–4% aller primären Zellkulturen sind hingegen Mykoplasmen nachgewiesen worden [G. J. McGarrity und H. Kotani (19-85) Cell culture mycoplasma, S. 353–390, In: S. Razin und M.F. Barile (Ed.), The mycoplasmas, Vol. IV, Mycoplasma pathogenicity. Academic press Inc., Orlando, Florida].

Als Kontaminationsquellen kommen die Verwendung von verunreinigten Medienzusätzen, wie fötales Kälberserum und Trypsin, das Labpersonal und kontaminierte Arbeitsgeräte und -flächen in Frage. Mykoplasmen können sich unter extremen Bedingungen vermehren, treten aber meist als extrazelluläre Parasiten tierischer Zellen auf. Mykoplasmen können die für die Replikation benötigten Nährstoffe nicht selbst synthetisieren. Es kommt zu einer Schädigung der Wirtszellen zum einen als Folge einer entsprechenden Abwehrreaktion, zum anderen durch die Wirkung der Stoffwechselprodukte der parasitierenden Mykoplasmen.

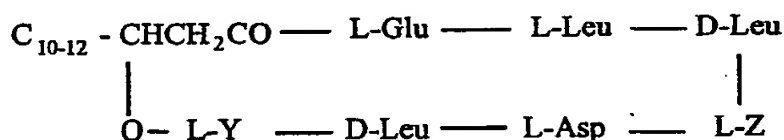
Mykoplasmen können Krankheitsbilder bei Menschen und Tieren, z. B. Labornagetieren, hervorrufen. Vorwiegend kommt es zu Erkrankungen der Respirationstrakte wie z. B. Pneumonien und Tracheobronchitis u. a., durch Mycoplasma pneumoniae, M. orale, M. salivarium, M. faucium und M. buccale oder des Urogenitaltraktes wie beispielsweise Urethritis und Urethrophrostatis durch M. hominis, M. fermentans oder Ureaplasma urealyticum.

Obwohl Mykoplasmen in Zellüberständen hohe Replikationszahlen aufweisen, bewirken sie häufig keine augenfälligen Veränderungen der befallenen Zellkulturen. Eine Entfernung von Mykoplasmen aus den Zellkulturen ist dennoch notwendig, da diese u. a. zu chromosomalen Abnormalitäten, Hemmung des Zellwachstums, Induktion von Cytokinen, Veränderung der Antigencharakteristik der Zelloberfläche und Beeinflussung des Zellmetabolismus führen können, die bei Experimenten nicht reproduzierbare und unzuverlässige Ergebnisse bewirken. Zellkulturen sind eine notwendige Voraussetzung für die Produktion diverser Pharmazeutika. Die Infektionssicherheit von biotechnologischen Pharmazeutika, z. B. Impfstoffen, monoklonalen Antikörpern oder rekombinanten Proteinen erfordert die Entfernung der häufig latent auftretenden Mykoplasmenkontamination, was grundsätzlich mit beträchtlichen Verlusten an Forschungszeit und -mitteln bzw. Produktivität verbunden ist. Zur Eliminierung von Mykoplasmen aus Zellkulturen und ihren Produkten sind verschiedenartige Antibiotika in Benutzung, die einzeln oder in Kombination appliziert werden [S. Coronato et al. (1994) J. Virol. Meth. 46 85–94; R.J. Hay et al. (19–89) Nature 339 487–488].

In der Regel sind Mykoplasmenkontaminationen nur schwer oder gar nicht vollständig zu beseitigen. Eine Behandlung von Medienzusätzen während der Aufbereitung durch Filtration an 0,1 µm Kerzenfilter stellt in praxi keinen absoluten Schutz dar [H. Rabenau und H.W. Doerr (1990) Die Infektionssicherheit biotechnologischer Pharmazeutika aus virologischer Sicht, S. 24, GIT VERLAG GmbH, Darmstadt]. Die Effizienz verschiedenartiger Antibiotikabehandlungen zur Eliminierung oder Suppression von Mykoplasmen aus unterschiedlichsten Umgebungen ist in der Weise meist unzureichend, daß über einen längeren Zeitraum Antibiotikakonzentrationen benötigt werden, die toxisch auf die zu schützenden Zellen wirken können. Die meisten der eingesetzten Antibiotika hemmen das Wachstum von Mykoplasmen. Die große Anzahl zellwandwirksamer Antibiotika findet keine Wirkung, da Mykoplasmen keine Zellwand besitzen.

Die Erfindung betrifft zyklische Fettsäure-haltige Lipopeptide gekennzeichnet durch eine bessere antibiotische Aktivität gegenüber Mikroorganismen der Klasse Mollicutes bei gleichzeitig geringerem zytotoxischen Effekt auf die Wirtszellen gegenüber bisher bekannten Antibiotika. Die hier beschriebenen Substanzen besitzen eine lytische Aktivität gegen Mollicuti und können so einzeln oder in Kombination angewendet zur vollständigen Eliminierung von Mykoplasmen in der Biotechnologie auf eine zeit- und arbeitssparende Weise und zur Bekämpfung von Krankheiten, hervorgerufen durch Vertreter dieser Mikroorganismenklasse, gegebenenfalls als Zusatzmittel in Arzneimitteln, eingesetzt werden.

Die in den Patentansprüchen gekennzeichneten zyklischen Lipopeptide können nach bereits beschriebenen Verfahren leicht hergestellt werden. Viele Lipopeptide werden u. a. vom Mikroorganismus Bacillus subtilis in vivo gebildet und in das umgebende Medium in hohen Konzentrationen sekretiert, aus dem sie dann isoliert werden können. Zu diesen Lipopeptiden gehört das Surfactin, das die folgende allgemeine Struktur aufweist, in der Y für die Aminosäuren Leu, Ile und Val und Z für die Aminosäuren Leu und Ala stehen:



Surfactin kommt in der Natur als Gemisch mit unterschiedlichen Fettsäurekomponenten und Aminosäuresequenzen in variablen Mengenteilen vor. Surfactin kann nach der Vorschrift von F. Baumgart et al. (1991),

Biochem. Biophys. Res. Commun. 177 998—1005, hergestellt werden.

Im folgenden werden Ausführungsbeispiele für die Verwendung zyklischer Lipopeptide zur Inaktivierung von Mykoplasmen beschrieben. Als Modellschubstanz für diese Untersuchungen wird das Surfactin gewählt, das als typischer Vertreter der in den Patentansprüchen beschriebenen zyklischen Lipopeptide angesehen werden kann.

Beispiel 1

Inaktivierung von Mykoplasmen in adhärenenten Zellkulturen

1. Ca. $1 \cdot 10^6$ frisch trypsinierte ML-Zellen (Nerz-Lungenzellen) bzw. CV1-Zellen (Nierenzellen der grünen Meerkatze), hochgradig kontaminiert mit Mycoplasma hyorhinis, wurden in einer Petrischale (10 cm Ø, Nunc) mit Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) frisch über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) und 40 µM Surfactin passagiert. Das Surfactin wurde dazu in Kulturmedium gelöst und über Spritzenvorfilter (Nalgene, Porenweite 0,1 µm) sterilfiltriert.
2. Die ML-Zellkultur wurde 3 Tage und die CV1-Zellkultur 8 Tage bei 37°C und 5 Vol.-% CO₂ bebrütet. Die Zellen waren zu hohen Dichten herangewachsen, bildeten einen homogenen Zellrasen und konnten mit 0,25% Trypsin, 2 mM EDTA, passagiert werden.
3. Nach zweimaliger Passage ohne Surfactin-Behandlung erfolgte der Mykoplasmenachweis durch Fluoreszenz-DNA-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4'-6-Diamidino-2'-phenylindol (DAPI, Boehringer Mannheim) entsprechend der Anleitung in der Produktbeschreibung, mit einem Mykoplasmen-spezifischen ELISA-Test (Boehringer Mannheim) sowie durch Nutzung der Polymerase-Kettenreaktion mit dem mycoplasma PCR primer set (Stratagene) entsprechend der Produktanleitung und nach der Vorschrift von F.J.M. van Kuppeveld et al. [Appl. Environ. Microbiol. 60 149—152 1994].

Nach Anwendung von Surfactin konnte in den getesteten Zellkulturen mit keinem der angewandten Nachweisverfahren eine Kontamination der ML- oder CV1-Kulturen mit Mykoplasmen festgestellt werden.

Beispiel 2

Inaktivierung von Mykoplasmen in Suspensionszellkulturen

1. Die humanen T-Helferzell-Linien Molt 4/8, MT-4, H9 bzw. Jurkat, hochgradig kontaminiert mit Mycoplasma orale, wurden jeweils in 10 ml RPMI 1640-Kulturmedium (GIBCO) mit 5% (v/v) über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO), 2 mM L-Glutamin (ICN) und 80 µM Surfactin, sterilfiltriert über einen Spritzenvorfilter (Nalgene, Porenweite 0,1 µm) suspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen (15 ml Volumen, Falcon) aufgenommen. Die Zelldichte betrug je Zelllinie ca. $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml.
2. Der Reaktionsansatz wurde durch intensives Vortexen von mindestens 30 Sekunden Dauer homogenisiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur unter permanentem Schwenken inkubiert.
3. Anschließend wurde die Zellsuspension 10 min bei 300 g zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 5 ml RPMI 1640-Kulturmedium mit 5% (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 30 µM Surfactin, sterilfiltriert über einen Spritzenvorfilter (Nalgene, Porenweite 0,1 µm), aufgenommen und in eine 50 ml-Plastikzellkulturflasche (Nunc) überführt.
4. Die Kultur wurde 4 Tage bei 37°C und 5 Vol.-% CO₂ bebrütet. Die Zellen waren zu hohen Dichten herangewachsen und wurden durch 10 minütige Zentrifugation bei 300 g pelletiert. Das Surfactin-haltige Medium wurde entfernt, die Zellen in 10 ml RPMI 1640-Kulturmedium mit 10% (v/v) inaktiviertem fötalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin aufgenommen und in eine 50 ml-Plastikzellkulturflasche (Nunc) überführt.
5. Nach weiteren 3 Tagen Bebrütung wurden die Zellen mit einem elektronischen Zellzählgerät (Modell CASY1, Schärfe System) gezählt. Die Zellen wurden entsprechend der jeweiligen Zelldichte in RPMI-Medium mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum und 2 mM Glutamin passagiert.
6. Nach zweimaliger Passage der Zellen ohne Surfactin erfolgte der Mykoplasmenachweis durch Nutzung der Polymerase-Kettenreaktion mit dem mycoplasma PCR primer set (Stratagene) entsprechend der Produktanleitung und nach der Vorschrift von F.J.M. van Kuppeveld et al. [Appl. Environ. Microbiol. 60 149—152 1994].

Nach der Surfactin-Behandlung war mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion keine Kontamination der Suspensionszellkulturen mit Mycoplasma orale nachweisbar. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollansätzen verringerten sich die Zelldichten nach der Behandlung auf 31% für die Molt 4/8, 55% für die H9-, 41% für die Jurkat- und 27% für die MT-4-Zellkultur.

Beispiel 3

Bestimmung der Zytotoxizität von Surfactin auf adhärenente Zellen

Die Bestimmung der zytotoxischen Wirkung der zyklischen Lipopeptide auf mykoplasmenkontaminierte, adhärenente Zellen in Kultur erfolgte in Abwandlung des Kristallviolett-Tests von D.A. Flick und G.E. Gifford [J. Immunol. Meth. 68 167—175 19-84].

1. Frisch trypsinierte Zellen der Linien ML (Nerz-Lungenzellen), CV1 (Nierenzellen der grünen Meerkatze), Hep₂ (humane Epithelzellen), CRFK (Katzen-Nierenzellen) und BHK21 (Hamster-Nierenzellen) wurden jeweils in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) frisch über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) aufgenommen und 100 µl Zellsuspension (ca. $1-2 \cdot 10^5$ Zellen/ml) in jeweils eine Vertiefung einer 96-Loch-Flachboden-Kulturplatte (Nunc) pipettiert. Die Kultur wurde 3 Stunden bei 37°C in Gegenwart 5 Vol.-% CO₂ bebrütet.

2. In Kulturmedium gelöstes Surfactin wurde sterilfiltriert (Nalgene Spritzenvorfilter, Porenweite 0,1 µm) und auf verschiedene Konzentrationen mit frischem Kulturmedium verdünnt. 50 µl des Nährmedium mit verschiedenen Konzentrationen Surfactin wurde zu den angewachsenen Zellen gegeben. Die Kulturplatte wurde weitere 2 Tage bei 37°C und in Gegenwart von 5 Vol.-% CO₂ bebrütet.

3. Die Zellen der Linien ML, Hep₂ und BHK21 waren nach 3 Tagen, die Zellen der Linien CV11 und CRFK nach 8 Tagen in den Kontrollreihen zu hohen Zelldichten herangewachsen und bildeten einen homogenen Zellrasen. Der Mediumüberstand wurde abgeschlagen und zu jedem Ansatz 50 µl Kristallviolett-Lösung pipettiert. Die Kristallviolett-Lösung setzte sich zusammen aus 3,75 g Kristallviolett, 1,75 g NaCl, 161,5 ml Ethanol abs., 43,2 ml 37%igem Formaldehyd (alle Chemikalien von Merck) ad 500 ml deionisiertes und destilliertes Wasser. Die Kristallviolett-Lösung wurde nach 20 min intensiv aus den Kavitäten mit deionisiertem Wasser herausgewaschen und die Mikrotiterplatte an der Luft getrocknet.

4. Der verbleibende zellgebundene Farbstoff wurde durch Zugabe von 100 µl einer Lösung aus 50% Ethanol abs., 0,1% Eisessig, 49,9% deionisiertem und destilliertem Wasser je Kavität in Lösung gebracht und durch intensives Schütteln über 5 Minuten homogen verteilt. Die photometrische Bestimmung der Farbintensität, die in linearem Zusammenhang zur Zelldichte steht, erfolgte bei 550 nm (EAR 400 AT, SLT-Labinstrumente). Es wurde die Konzentration ermittelt, die eine Reduzierung der Zellzahl um 50% bewirkte.

Bei diesem Test konnte für das Surfactin ein zytotoxischer Effekt von 50% bei einer Mediumkonzentration von 4–8 µM für die Hep₂-, von 37 µM für die BHK21-, von 45 µM für die CRFK- und von 43 µM für die ML-Zellen ermittelt werden. Die CRFK- und Hep₂-Zellen zeigten bei Konzentrationen bis zu 30 µM Surfactin keine Veränderungen der Zelldichte. Bei den ML- und BHK21-Zellen wurde bei dieser Surfactin-Konzentration eine Wachstumsverringierung um 15% beobachtet. Die in Beispiel 1 angewandte Konzentration von 40 µM Surfactin bewirkte eine Reduzierung der Zelldichte auf 15% bei den CRFK- und Hep₂-Zellen, auf 45% bei den ML-Zellen und auf 57% bei den BHK21-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollansätzen. Keine der getesteten Kulturen tolerierte höhere Surfactin-Konzentrationen als 65 µM.

Patentansprüche

1. Verwendung von synthetisierten oder natürlich vorkommenden zyklischen Lipopeptiden sowie deren Salze in Verbindung mit Zell-, Gewebe- und Organkulturen bzw. Labortieren und Pflanzen, eingesetzt zum Zwecke der Inaktivierung von bzw. zum Schutz vor Infektionen durch Mikroorganismen der Klasse Mollicutes.

2. Verwendung von synthetisierten oder natürlich vorkommenden zyklischen Lipopeptiden sowie deren Salze für die Herstellung oder als Zusatz zu biotechnologischen Erzeugnissen, Pharmazeutika und sonstigen Substanzen zum Zwecke der Inaktivierung von bzw. zum Schutz vor Infektionen durch Mikroorganismen der Klasse Mollicutes.

3. Verwendung von synthetisierten oder natürlich vorkommenden zyklischen Lipopeptiden sowie deren pharmakologisch verträglichen Salze für die Herstellung von Heilmitteln oder als Bestandteil von Heilmitteln mit Wirkung gegen Mikroorganismen der Klasse Mollicutes.